

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K15411

研究課題名(和文)慢性ストレス関連疾患の機序の解明と治療標的の探索

研究課題名(英文)The exploration of pathophysiology of chronic stress and its therapeutic targets

研究代表者

竹下 享典 (Takeshita, Kyosuke)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：70444403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレスはメタボリック症候群、糖尿病、高尿酸血症、血栓症の原因となりうるが、機序は不明であった。我々は拘束ストレスによるマウス慢性ストレスモデルを解析して、ストレスは内臓脂肪の融解によって慢性炎症が起こすこと、そしてその結果これらの病態を引き起こすことを示した。この慢性脂肪炎症にDPP-4、XORがかかわっており、これらの阻害薬がストレス関連疾患の治療に有効であることを示した。過敏性腸症候群の動物モデルである同モデルにおいて、腸管炎症にレニンアンギオテンシン系が関わっていることを明らかにした。その影響は腸内細菌叢とセロトニン代謝にも及ぶ。アンギオテンシン受容体阻害薬がこの病態を改善した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性ストレスはメタボリック症候群、糖尿病、高尿酸血症、血栓症の原因となりうるが、機序は不明であったが、これを明らかにした。特に高血圧、糖尿病、高尿酸血症治療薬でこれらの病態を抑えることができたのは drug repositioning、成人病、メタボリック症候群の治療の動機付けになると考える。これらの結果についてプレスリリースを行ったところ、マスコミ各社より取材、SNSで話題になるなど社会的な関心の高さがうかがえた。

研究成果の概要(英文)：Chronic stress is closely linked to the metabolic syndrome, diabetes, hyperuricemia and thromboembolism, but the mechanisms remain elusive. We reported that stress targets visceral adipose tissue (VAT), inducing lipolysis, low-grade inflammation with production of inflammatory adipokines, metabolic derangements such as insulin resistance, and prothrombotic state. We recently showed that DPP-4 and xanthine oxidoreductase (XOR) are involved in the VAT inflammation.

Furthermore, two-week daily restraint stress activated the classical renin-angiotensin system (RAS) to evoke intestinal inflammation in mice, and perturbate microbiota and serotonin metabolism. The treatments with DPP-4 inhibitor, XOR inhibitor, and angiotensin II receptor blocker respectively improved the stress-induced pathology.

研究分野：内科学一般(含心身医学)

キーワード：ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代社会と不可分であるストレスが健康問題として挙げられるのは、精神衛生上の問題のみならず、血栓症、高血圧症、耐糖能障害などの生活習慣病の基盤となる点である。ストレスが生活習慣病の発症、重症化に寄与し、重篤な血栓症を引き起こすことは、災害被災地のようなトラウマを伴う非日常的なストレスをもたらす状況のみならず、就労状況などの日常の小さな慢性ストレスも関与することが、労働衛生研究においても明らかになった。日常生活のストレスが持続することで健康を傷害するにも関わらず、慢性ストレス関連疾患の病態の解析は進んでいない。我々はマウス拘束ストレスモデルを用いて、慢性ストレスの全身臓器における悪影響をストレス関連疾患と定義づけ、その機序、治療標的の解明を試みてきた(*Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, Diabetes 2012, Plos One 2014*)。

2. 研究の目的

マウスに拘束ストレスを1日2時間連日繰り返すと、1週間では変化が起こらなかったが、2週間で内臓脂肪は萎縮し、慢性炎症を起こすことを初めて明らかにした(*Diabetes 2012*)。ストレスに対する応答の端緒は、交感神経系の活性化とコルチゾルの増加であるが、これに反応して、脂肪組織で融解が促進し、血中の遊離脂肪酸が増加する(左図)。遊離脂肪酸は脂肪組織の Toll-like receptor4 を活性化し、慢性炎症を引き起こす。ストレスの標的となる臓器のひとつが脂肪組織であり、その結果、インスリン抵抗性が増悪し、脂肪で誘導された plasminogen activator inhibitor (PAI-1)と組織因子が微小血栓を形成させることを我々は初めて明らかにした(*Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, Diabetes 2012*)。一連の変化はメタボリック症候群の機序と一致しており、ストレスと生活習慣病が不可分であることを強く裏付けている。我々は疾患モデルマウスの解析を用いて(*Circulation2005,2009,2010, Circ Res2007, Lab Invest2011*)、循環

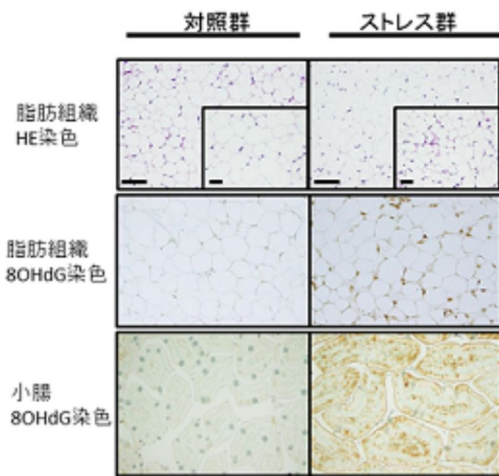


器疾患における PAI-1 の役割を検討してきた(*Am J Pathol.2004,Thromb Res.2003,Semin Thromb Hemost.2002, 2014*)。ストレスにより誘導される PAI-1 の発現は、脂質代謝改善薬で抑制できるため(*Thromb Res2007, 2009*)、ストレス関連疾患は薬剤による予防可能な病態と考える。本研究では、マウス拘束ストレスモデルについて、脂肪組織のみならず、心臓、肝臓、腸管など主要組織の臓器炎症、生活習慣病、凝固因子などの血栓症にかかわる分子の発現を明らかにする。さらに DNA microarray、メタボローム解析を用いて、糖、脂質、アミノ酸代謝の変化と治療標的を網羅的に解析する。本研究では、ストレス関連疾患の動物モデルを解析して、新しい臓器間の連関である“Metabolic Information Highway”の解明し、ストレスによる臓器炎症、酸化ストレスを介した血栓症、生活習慣病の新しい治療標的の発見することを目的とする。

3. 研究の方法

1. マウス慢性拘束モデルの作製と病理解析

マウスに1日2時間の拘束ストレスを反復したところ、1週間では変化は起こらず、2週間で内臓脂肪の萎縮と炎症を認めた(*Diabetes 2012*)。これより2週間の慢性ストレスの影響を、主要臓器について網羅的に病理学的所見、炎症を反映する単球の表面マーカー、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー、凝固因子の発現、fibrin 血栓の分布について免疫組織染色、real time RT-PCR 法を用いて解析した。我々は、すでに脂肪組織において、PAI-1 と組織因子が血栓傾向を惹起し微小血栓を形成させること、単球浸潤と炎症性 adipokine が増加することを報告している(*PNAS2002 Cardiovasc Res.2005 Diabetes 2012 Semin Thromb Hemost 2014*)。



さらに我々は脂肪および小腸・大腸の病変的変化と酸化ストレス、炎症性サイトカインの局在を解析した。1週間の反復ストレスでは所見がなかったにも関わらず、2週間後にはストレスによる脂肪炎症と腸管組織における、炎症、酸化ストレスの増大を確認している。(図左上段内臓脂肪の単球浸潤、左対照、右ストレス後 中断内臓脂肪、下段小腸 8-OHdG 染色(酸化ストレスマーカー)左対照、右ストレス後)。腸管における炎症は腸内フローラに影響を与えることが考えられる。そこで、糞便の腸内フローラの変化を T-RFLP フローラ解析して、脂質・糖代謝の変化と比較検討した。さらに代謝に関与する分子を検討するために、レニン-アンギオテンシン系、DPP-4-インクレチン系、コレステロール代謝、酸化ストレスにかかわる分子の主要臓器にお

ける発現、血中濃度について解析を進めた。現在のところ、脂肪組織において、交感神経系とレニン-アンギオテンシン系の活性化と、アンギオテンシン受容体阻害薬の投与による、脂肪炎症とインスリン抵抗性の改善を確認した (*Plos One* 2014, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2016 Apr;27(3):358-60.)。特に脂肪組織の慢性炎症と糖尿病の発症にかかわる分子に着目し、免疫組織染色、real time RT-PCR 法を用いてこれらの分子の発現の変化を観察する。我々は腸管と脂肪組織の炎症所見に相関して、インスリン代謝を改善する腸管ホルモン・インクレチン、そしてこれを代謝する DPP-4 の血中濃度と組織発現に現れる変化に着目し解析した。

[評価方法]

マウス慢性ストレスモデル：マウス(8週齢 C57bl)を 50ml conical tube に 1日2時間拘束する。以下の項目につき比較検討する (一部予備実験済み)

モニタリング：食餌量、体重計測。血圧：tail cuff 法による小動物用血圧計(UR-5000)

病理検体の採取：血清、心臓、胸部大動脈、腎臓、肝臓、骨格筋、鼠蹊部内臓脂肪

- 免疫組織染色、RT-PCR、ELISA による炎症・糖代謝にかかわる発現変化の解析
- 炎症細胞浸潤の評価(CD11b 染色、MOMA2 などの単球のマーカーの発現を RT-PCR で定量) 炎症性 adipokine (TNF-alpha、IL-6、MCP-1) 血漿 ELISA および主要臓器のサンプルの real time RT-PCR assay による定量
- 酸化ストレスマーカーの発現分布を脂肪組織、小腸・大腸を 8-OHdG 染色、血清の ELISA により評価。
- 糖負荷およびインスリン感受性試験 糖代謝、インクレチン代謝にかかわる分子の発現、DPP-4 活性の評価
- 糞便の腸内フローラの変化を T-RFLP フローラ解析

4. 研究成果

マウス拘束ストレスモデルにおいて1日2時間、2週間拘束を繰り返し行くと、内臓脂肪において dipeptidyl peptidase-IV (DPP-4)の発現と血清 DPP-4 活性は増加し、これに伴い血中 glucagon-like peptide-1 (GLP-1)と血中インスリン値は低下した。また、内臓脂肪組織における DPP-4 の誘導に伴い酸化酵素 NOX4 が増加した。その結果、脂肪組織と血液中において、酸化ストレスマーカー8-OHdG は増加し、炎症性サイトカイン (MCP-1 IL-6 TNF- α) の発現も増加した。一方 adiponectin は減少した。DPP-4 阻害薬 alogliptin をこれらのマウスに 15mg/kg/day あるいは 45mg/kg/day を投与したところ、用量依存性に、脂肪組織の慢性炎症、酸化ストレスの産生を抑制した。その結果、ストレスによって増悪していたインスリン感受性が改善した。ストレスにより、凝固因子である組織因子と PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)が内臓脂肪において増加していたが、alogliptin 投与で、これも用量依存性に減少した。以上よりストレス関連疾患の治療標的の一つが DPP-4 であることが解明された (*Psychoneuroendocrinology*. 2016 Nov;73:186-195.)。

上記と同様のマウス拘束ストレスモデルにおいて、内臓脂肪、肝臓、小腸においてキサンチン酸化還元酵素(XOR)の発現と活性は増加し、血中尿酸値も上昇した。これに伴い、内臓脂肪組織において、NADPH オキシダーゼは増加し、superoxide dismutase (SOD) は減少していた。その結

果、脂肪組織と血液中において酸化ストレスは増加し、炎症性サイトカイン (MCP-1 IL-6 TNF- α) の発現も増加した。adiponectin は減少した。キサンチン酸化酵素阻害薬 febuxostat をこれらのマウスに 1mg/kg/day あるいは 5mg/kg/day を投与したところ、用量依存性に、脂肪組織の慢性炎症、酸化ストレスの産生を抑制した。その結果、ストレスによって増悪していたインスリン感受性が改善した。ストレスにより、凝固因子である組織因子と PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) が内臓脂肪において増加していたが、febuxostat 投与で、これも用量依存性に減少した。以上よりストレス関連疾患の治療標的の一つがキサンチン酸化還元酵素であることが解明された (Sci Rep. 2017 Apr 28;7(1):1266.)。

マウスストレスモデルは過敏性腸症候群の治療標的として知られる。上記と同様のマウス拘束ストレスモデルを解析すると、大腸において、炎症細胞浸潤、粘膜下浮腫が認められた。大腸においては、レニン - アンジオテンシン系が活性化し、NOX-4 の増加による酸化ストレス、炎症性サイトカインの増加を認めた。一方、小腸ではトリプトファンを吸収するアミノ酸トランスポーターである ACE2/B⁰AT-1 が減少し、それに伴い血中のトリプトファンは減少しました。一方トリプトファンからセロトニンへ代謝する酵素 (tryptophan hydroxylase) も減少し、血中のセロトニンは減少した。ストレスにより、小腸から分泌される抗菌物質アルファディフェンシンも減少するため、腸内環境は悪化し、*Bifidobacterium* と *Lactobacillales spp* の割合が低下、*Clostridium cluster* の割合が増加した。アンジオテンシン 受容体拮抗薬・irbesartan をこれらのマウスに 3mg/kg/day あるいは 10mg/kg/day を投与したところ、用量依存性に、ストレスによって活性化していた腸管のレニン - アンジオテンシン系を抑制しました。その結果、ストレスによる腸管の慢性炎症は改善し、トリプトファンの吸収、セロトニン産生、腸内環境のいずれも改善しました (Brain Behav Immun. 2018 Mar ;69:167-179.)。以上の結果より腸管レニン - アンジオテンシン系はストレス状況下の脳腸連関に重要な役割を果たし、過敏性腸症候群の治療標的として注目される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lei Yanna, Yang Guang, Hu Lina, Piao Limei, Inoue Aiko, Jiang Haiying, Sasaki Takeshi, Zhao Guangxian, Yisireyili Maimaiti, Yu Chenglin, Xu Wenhui, Takeshita Kyosuke, Okumura Kenji, Kuzuya Masafumi, Cheng Xian Wu	4. 巻 243
2. 論文標題 Increased dipeptidyl peptidase-4 accelerates diet-related vascular aging and atherosclerosis in ApoE-deficient mice under chronic stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 413 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2017.05.062	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yisireyili Maimaiti, Hayashi Motoharu, Wu Hongxian, Uchida Yasuhiro, Yamamoto Koji, Kikuchi Ryosuke, Shoaib Hamrah Mohammad, Nakayama Takayuki, Wu Cheng Xian, Matsushita Tadashi, Nakamura Shigeo, Niwa Toshimitsu, Murohara Toyooki, Takeshita Kyosuke	4. 巻 7
2. 論文標題 Xanthine oxidase inhibition by febuxostat attenuates stress-induced hyperuricemia, glucose dysmetabolism, and prothrombotic state in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1266-1266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-01366-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhu Enbo, Hu Lina, Wu Hongxian, Piao Limei, Zhao Guangxian, Inoue Aiko, Kim Weon, Yu Chenglin, Xu Wenhui, Bando Yasuko K., Li Xiang, Lei Yanna, Hao Chang Ning, Takeshita Kyosuke, Kim Woo Shik, Okumura Kenji, Murohara Toyooki, Kuzuya Masafumi, Cheng Xian Wu	4. 巻 6
2. 論文標題 Dipeptidyl Peptidase 4 Regulates Hematopoietic Stem Cell Activation in Response to Chronic Stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 6394-6394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.117.006394	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hamrah Mohammad Shoaib, Hamrah Mohammad Hassan, Ishii Hideki, Suzuki Susumu, Hamrah Mohammad Hussain, Hamrah Ahmad Edris, Dahi Ahmad Elias, Takeshita Kyosuke, Yisireyili Maimaiti, Hamrah Mohammad Hashem, Fotouhi Akbar, Sakamoto Junichi, Murohara Toyooki	4. 巻 2018
2. 論文標題 Anxiety and Depression among Hypertensive Outpatients in Afghanistan: A Cross-Sectional Study in Andkhoy City	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hypertension	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/8560835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yisireyili Maimaiti, Uchida Yasuhiro, Yamamoto Koji, Nakayama Takayuki, Cheng Xian Wu, Matsushita Tadashi, Nakamura Shigeo, Murohara Toyooki, Takeshita Kyosuke	4. 巻 69
2. 論文標題 Angiotensin receptor blocker irbesartan reduces stress-induced intestinal inflammation via AT1a signaling and ACE2-dependent mechanism in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain, Behavior, and Immunity	6. 最初と最後の頁 167~179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbi.2017.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wulamu Wubulikasimu, Yisireyili Maimaiti, Aili Aikebaier, Takeshita Kyosuke, Alimujiang Aziguli, Aipire Aliyeguli, Li Yiliang, Jiang Yuan, Aizezi Maimaitiaili, Li Zanlin, Abudureyimu Kelimu	4. 巻 19
2. 論文標題 Chronic stress augments esophageal inflammation, and alters the expression of transient receptor potential vanilloid ¹ and protease-activated receptor 2 in a murine model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 5386-5396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2019.10192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeshita Kyosuke	4. 巻 65
2. 論文標題 Sharpening the Focus: Acupuncture Interrupts the Brain-Gut Vicious Cycle Underlying Functional Dyspepsia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences	6. 最初と最後の頁 1578~1580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-020-06080-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yisireyili Maimaiti, Takeshita Kyosuke, Hayashi Motoharu, Wu Hongxian, Uchida Yasuhiro, Yamamoto Koji, Kikuchi Ryosuke, Hao Chang-Ning, Nakayama Takayuki, Cheng Xian Wu, Matsushita Tadashi, Nakamura Shigeo, Murohara Toyooki	4. 巻 73
2. 論文標題 Dipeptidyl peptidase- IV inhibitor alogliptin improves stress-induced insulin resistance and prothrombotic state in a murine model	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Psychoneuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 186 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psyneuen.2016.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 竹下享典
2. 発表標題 Xanthine oxidase inhibitor attenuates stress-induced hyperuricemia and prothrombotic state
3. 学会等名 第40回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----